

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2004年12月2日 (02.12.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/104222 A1

(51) 国際特許分類7:

C12Q 1/66, A01K 67/027

(21) 国際出願番号:

PCT/JP2004/007245

(74) 代理人: 西澤 利夫 (NISHIZAWA,Toshio); 〒107-0062 東京都港区南青山6丁目11番1号スリーエフ南青山ビルディング7F Tokyo (JP).

(22) 国際出願日:

2004年5月20日 (20.05.2004)

(25) 国際出願の言語:

日本語

(26) 国際公開の言語:

日本語

(30) 優先権データ:

特願2003-145466 2003年5月22日 (22.05.2003) JP

(71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 独立行政法人科学技術振興機構 (JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY AGENCY) [JP/JP]; 〒332-0012 埼玉県川口市本町4丁目1番8号 Saitama (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 梅澤 喜夫 (UMEZAWA,Yoshio) [JP/JP]; 〒162-0063 東京都新宿区市ヶ谷築王寺町45-1-203 Tokyo (JP). 貝原 麻美 (KAIHARA,Asami) [JP/JP]; 〒113-0023 東京都文京区向丘2-8-4-701 Tokyo (JP). 小澤 岳昌 (OZAWA,Takeaki) [JP/JP]; 〒270-2253 千葉県松戸市日暮5-195-207 Chiba (JP). 佐藤 守俊 (SATO,Moritoshi) [JP/JP]; 〒113-0023 東京都文京区向丘2-8-4-701 Tokyo (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:
— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイド」を参照。

WO 2004/104222 A1

(54) Title: PROBES FOR ANALYZING INTERACTION BETWEEN PROTEINS AND METHOD OF ANALYZING INTERACTION BETWEEN PROTEINS USING THE SAME

(54) 発明の名称: 蛋白質相互作用解析用プローブ及びそれを用いた蛋白質相互作用の解析方法

(57) Abstract: It is intended to provide probes for analyzing an interaction between proteins which are probes for analyzing an interaction between two proteins consisting of two probes, i.e., a probe A containing at least a polypeptide in the N-terminal side of renilla luciferase and a probe B containing at least a polypeptide in the C-terminal side of renilla luciferase.

(57) 要約: 二つの蛋白質間の相互作用を解析するためのプローブであって、少なくともレニラルシフェラーゼのN-末端側のポリペプチドを含むプローブAと、少なくともレニラルシフェラーゼの残るC-末端側のポリペプチドを含むプローブBの二つのプローブからなる蛋白質相互作用解析用プローブを提供する。

明細書

蛋白質相互作用解析用プローブ及び
それを用いた蛋白質相互作用の解析方法

5

技術分野

この出願の発明は、生細胞内の、どこで、いつ蛋白質－蛋白質相互作用が生起したかを検出・定量するための蛋白質相互作用解析用プローブと、それを用いた蛋白質－蛋白質相互作用の解析方法に関するものである。さらに詳しくは、この出願の発明は、生細胞内や個体内における種々の蛋白質－蛋白質相互作用に関わる細胞内シグナル増強／抑制物質を、精度高く、高速にスクリーニングすることを可能とする蛋白質相互作用解析用プローブと、それを用いた蛋白質－蛋白質相互作用解析方法に関するものである。

背景技術

生細胞の構築や機能においては、蛋白質－蛋白質相互作用が重要な役割を果たしていることが知られている。また、遺伝子の転写機構や細胞内シグナル伝達などにおいても、蛋白質相互作用が関連することが知られている。

従来、蛋白質－蛋白質相互作用を解析するための方法としては、スプリット酵素法が報告されている (Rossi, F., Charlton, C. A. and Blau, H. M., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 8405-8410, 1997; Remy, I., and Michnick, S. W., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96, 5394-5399, 1999;

Pelletier, J. N., Arndt, K. M., Pluckthun, A., and Michnick, S. W., *Nature Biotech.* 17, 683-690, 1999; Karimova, G., Pidoux, J., Ullmann, A., and Ladant, D., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 5752-5756)。この方法では、開裂した酵素が蛋白質－蛋白質相互作用により再構築され、それにより復旧された酵素活性を菌や細胞の表現型、あるいは蛍光性酵素基質によって測定して蛋白質－蛋白質相互作用を検出する。

しかし、このようなスプリット酵素法では、酵素反応に時間をする上、酵素反応により產生された蛍光性酵素基質が安定な物質であり、細胞内において拡散するため、蛋白質相互作用が起きた場所や時を細胞内で特定できないという問題があった。

そこで、この出願の発明者らは、あらゆる蛋白質について高い精度で簡便に蛋白質－蛋白質相互作用を解析できるプローブとして、蛋白質相互作用により生起するプロテインスプライシングにより発光酵素やGFPが生成され、発光酵素などの酵素活性やGFPのフルオロフォアが再生される蛋白質相互作用解析用プローブを作成し、報告している（特願2000-224939；PCT/JP00/09348）。

しかし、酵素の蛍光性生成物やGFPなどのフルオロフォアは拡散性であるため、このような蛋白質相互作用解析用プローブでも、蛋白質－蛋白質相互作用がいつ、どの部位で生じたのかを特定することは困難であったのが実情である。

そこで、この出願の発明は、以上の通りの事情に鑑みてなされたものであり、従来技術の問題点を解消し、生細胞内の、どこで、いつ蛋白質－蛋白質相互作用が生起したかを検出・定量する

ためのプローブと、それを用いた蛋白質－蛋白質相互作用の解析方法を提供することを課題としている。

発明の開示

5 この出願の発明は、上記の課題を解決するものとして、第 1 には、二つの蛋白質間の相互作用を解析するためのプローブであって、少なくともレニラルシフェラーゼの N－末端側のポリペプチドを含むプローブ A と、少なくともレニラルシフェラーゼの残る C－末端側のポリペプチドを含むプローブ B の二つのプローブからなることを特徴とする蛋白質相互作用解析用プローブを提供する。

この出願の発明は、第 2 には、前記の蛋白質相互作用解析用プローブに関連して、intein の N－末端側のポリペプチドとレニラルシフェラーゼの N－末端側のポリペプチドを含むプローブ A と、intein の C－末端側のポリペプチドとレニラルシフェラーゼの残る C－末端側のポリペプチドを含むプローブ B の二つのプローブからなる蛋白質相互作用解析用プローブを提供する。

この出願の発明は、また、第 3 には、レニラルシフェラーゼの N－末端側のポリペプチドと、レニラルシフェラーゼの残る C－末端側のポリペプチドに、各々リンカー配列が結合している前記いずれかの蛋白質相互作用解析用プローブを、第 4 には、リンカー配列が 3～20 アミノ酸残基からなるものである前記の蛋白質相互作用解析用プローブを提供する。

さらに、この出願の発明は、第 5 には、レニラルシフェラーゼの N－末端側のポリペプチドとレニラルシフェラーゼの残る C－末端側のポリペプチドが、レニラルシフェラーゼを Ser91 と

Tyr92 の間で分割して得られるものである前記いずれかの蛋白質相互作用解析用プローブを提供する。

この出願の発明は、さらに、第 6 には、前記いずれかのプローブ A を連結した蛋白質 a と前記いずれかのプローブ B を連結した蛋白質 b を、セレンテラジンと酸素の存在下で共存させ、発光を測定することを特徴とする蛋白質相互作用の解析方法を提供する。

また、この出願の発明は、第 7 には、前記いずれかのプローブ A を連結した蛋白質 a と前記いずれかのプローブ B を連結した蛋白質 b を発現するポリヌクレオチドを細胞内に導入することによりプローブ A を連結した蛋白質 a とプローブ B を連結した蛋白質 b をセレンテラジンと酸素の存在下で共存させる蛋白質相互作用の解析方法を提供する。

この出願の発明は、第 8 には、前記いずれかのプローブ A を連結した蛋白質 a と前記いずれかのプローブ B を連結した蛋白質 b を発現するポリヌクレオチドを細胞内に導入し、非ヒト動物全能性細胞を個体発生することによって、この動物またはその子孫動物の全細胞においてプローブ A を連結した蛋白質 a とプローブ B を連結した蛋白質 b をセレンテラジンと酸素の存在下で共存させる蛋白質相互作用の解析方法を提供する。

さらに、この出願の発明は、第 9 には、前記いずれかのプローブ A を連結した蛋白質 a と前記いずれかのプローブ B を連結した蛋白質 b を発現するポリヌクレオチドを細胞内に導入し、非ヒト動物全能性細胞を個体発生することによって得られる非ヒト動物またはその子孫動物を提供する。

そして、第 10 には、前記非ヒト動物またはその子孫動物に検査

試料を導入し、該非ヒト動物またはその子孫動物の細胞における蛋白質相互作用を解析する物質のスクリーニング方法をも提供する。

5 図面の簡単な説明

図 1 は、この出願の発明の蛋白質相互作用解析用プロープの一例とその作用原理を表す概略模式図である。

図 2 は、この出願の発明の蛋白質相互作用解析用プロープの別の例とその作用原理を表す概略模式図である。

10 図 3 は、この出願の発明の実施例において使用されたレニラルシフェラーゼのアミノ酸配列と分割部位を示した概略模式図である。

15 図 4 は、この出願の発明の実施例において使用されたスプリットレニラルシフェラーゼ融合蛋白質 (sRL) のプラスミドの構成を示した図である。(a : hRL124C/A、 b : sRL、 c : sRL91 の N
－末端側、 d : sRL91 の C－末端側、 e : sRL91F)

20 図 5 は、この出願の発明の実施例において、レニラルシフェラーゼの分割箇所と、蛋白質相互作用により生起した発光の関係を示した図である。(a : インスリンの存在下における発光とインスリンの非存在下における発光の比、 b : 全長レニラルシフェラーゼ (hRL124C/A) による発光強度に対する各蛋白質相互作用解析用プロープの相対発光強度)

25 図 6 は、この出願の発明の実施例において、 sRL91F を用いた際のインスリン存在下および非存在下での発光強度を示した図である。(a : sRL91F、 b : sRL91 の N－末端側のみ、 c : sRL91F の C－末端側のみ)

図 7 は、この出願の発明の実施例において、sRL91 を用いた際のインスリンの添加量と Y941 と SH2n の間の相互作用の経時変化を示した図である。

図 8 は、この出願の発明の実施例において、sRL91 を用いた際のインスリン添加後の Y941 と SH2n の相互作用の経時変化をイムノプロッティングにより示した図である。

図 9 は、この出願の発明の実施例において、CHO-IR 細胞の顕微鏡像を示す写真である。(a : sRL91 を発現した CHO-IR 細胞においてインスリン刺激の非存在下、b : 10-7M インスリン刺激の存在下、c : 全長レニラルシフェラーゼ (hRL124C/A) を発現した CHO-IR 細胞)

図 10 は、アダプタープロテイン Shc と Grb の相互作用機構を示した概略模式図である。

図 11 は、この出願の発明の実施例において、Shc の 3カ所のチロシン基をフェニルアラニン基に、PTB ドメイン内のセリン基をプロリン基に置換した各種変異体と Grb2 との相互作用を定量的に評価した結果を示した図である。(a : EGF、b : E2、c : DHT、d : DES 添加)

なお、図中の各符号は次のものを示す。

20 1 蛋白質相互作用解析用プローブ

1 a プローブA

1 b プローブB

1 c プローブC

1 d プローブD

25 2 レニラルシフェラーゼ

2 a N-スプリットレニラルシフェラーゼ

2 b C-スプリットレニラルシフェラーゼ

3 a 蛋白質 a

3 b 蛋白質 b

4 生物発光

5 5 a リンカー配列

5 b リンカー配列

6 a intein の N-末端側のポリペプチド

6 b intein の C-末端側のポリペプチド

I 共存

10 II 相互作用

III 再構成

III' 切り出し

IV 酸化分解

V 発光

15

発明を実施するための最良の形態

この出願の発明の蛋白質相互作用解析用プローブは、標識物質としてレニラルシフェラーゼを用いることを特徴とするものである。

20 レニラルシフェラーゼ (Lorenz, W. W. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 4438-4442 (1991).) (配列番号 1) は、ホタルルシフェラーゼの約半分の分子量 (36 kDa) を有するモノマー蛋白質であり、哺乳類細胞内で容易に発現することが知られている。また、レニラルシフェラーゼの結晶構造は不明である
25 が、ルミネッセンス活性のためには N-末端といくつかのシステム残基が重要であり (Paulmurugan, R. et al. *Proc. Natl.*

Acad. Sci. USA 99, 15608-13 (2002); Liu, J. et al. *Gene* 203, 141-148 (1997).), レニラルシフェラーゼの酵素反応は、ホタルルシフェラーゼの場合とは異なり、ATP を必要としない (Liu, J. & Escher, A. *Gene* 237, 153-159 (1999).) ことが 5 知られている。さらに、ルシフェラーゼの基質であるセレンテラジンは哺乳類の細胞膜を貫通し、細胞基質中に急速に拡散することも知られている (Contag, C. H. & Bachmann, M. H. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 4, 235-260 (2002); Greer, L. F. & Szalay, A. A. *Luminescence* 17, 43-74 (2002).)。

10 レニラルシフェラーゼは、溶存酸素存在下においてセレンテラジンの励起状態化合物（オキシセレンテラジンモノアニオン）への酸化を触媒し、組織透過性を有する近赤外線領域（400nm～630nm）の広いバンドのルミネッセンスを発し、セレンテルアミドと二酸化炭素を生じさせる。

15 この出願の発明者らは、このようなレニラルシフェラーゼの酵素反応に着目し、生細胞のどこで、いつ蛋白質相互作用が起こったのかを精度高く検出できるプローブを実現することを目的として銳意研究を進めた結果、本願発明に至ったのである。

図1および図2にこの出願の発明の蛋白質相互作用解析用プローブの構成と作用原理を示した。

この出願の発明の蛋白質相互作用解析用プローブ(1)は、図1に示されるように、少なくともレニラルシフェラーゼのN-末端側のポリペプチド(2a)を含むプローブA(1a)と、少なくともレニラルシフェラーゼの残るC-末端側のポリペプチド(2b)を含むプローブB(1b)からなるものである(以下、このように分割されたレニラルシフェラーゼのN-およびC-末

端をN-スプリットレニラルシフェラーゼ、C-スプリットレニラルシフェラーゼと呼ぶことがある。)。

そして、この出願の発明の蛋白質相互作用解析用プローブを用いて蛋白質相互作用を解析するには、プローブA(1a)および
5 プローブB(1b)を各々、その相互作用を調べたい二つの蛋白質aおよびb(3aおよび3b)に結合し、これらをセレンテラジンと溶存酸素の存在下で共存させる(I)。このとき、蛋白質(3a)および(3b)が相互作用する(II)と、プローブA(1a)およびB(1b)におけるN-スプリットレニラルシフェラーゼ(2a)
10 とC-スプリットレニラルシフェラーゼ(2b)が近位に並置され、レニラルシフェラーゼ(2)の再構成が起こる(III)。そして、このレニラルシフェラーゼ(2)が発光触媒酵素として作用し、瞬時に、セレンテラジンを酸化分解し
15 (IV)、生成される励起カルボニル基が基底状態に戻るときのエネルギーが生物発光(4)として放出されるのである(V)。したがって、この生物発光(4)を検出することにより蛋白質-蛋白質相互作用を解析することが可能となる。

以上のとおりのこの出願の発明の蛋白質相互作用解析用プローブ(1)において、プローブA(1a)とプローブB(1b)
20 は、各々、N-およびC-スプリットレニラルシフェラーゼのみからなるものであってもよいが、それぞれさらに、inteinのN-末端側のポリペプチド(6a)とinteinのC-末端側のポリペプチド(6b)を含有していてもよい。

すなわち、この場合、図2に示されるように、蛋白質相互作用
25 解析用プローブ(1)において、プローブAは、inteinのN-末端側のポリペプチド(6a)とレニラルシフェラーゼのN-末

端側のポリペプチド（2 a）を含むもの（以下プローブA' と呼ぶ）（1 c）となり、プローブBは、intein のC－末端側のポリペプチド（6 b）とレニラルシフェラーゼの残るC－末端側のポリペプチド（2 b）を含むもの（以下プローブB' と呼ぶ）（1 d）となる。

このような蛋白質相互作用解析用プローブを用いて蛋白質相互作用解析を解析するには、プローブA'（1 c）およびプローブB'（1 d）を各々相互作用を調べたい蛋白質a およびb（3 a および3 b）に結合し、共存させる（I）。このとき、蛋白質（3 a および3 b）が相互作用すれば（II）、スプライシングが起こり、各スプリットレニラルシフェラーゼ（2 a、2 b）が連結してレニラルシフェラーゼ（2）が再構成される（III）。

このとき、系内にセレンテラジンと酸素が共存していると、切り出された（III'）レニラルシフェラーゼ（2）を発光触媒酵素として、瞬時に、膜透過性基質であるセレンテラジンの酸化分解が起こり（IV）、励起カルボニル基が基底状態に戻るときのエネルギーが生物発光（4）として放出される（V）。したがって、この生物発光（4）を検出することにより蛋白質－蛋白質相互作用を解析することが可能となる。

一方、蛋白質a（3 a）と蛋白質b（3 b）が相互作用（II）しなければ、intein のスプライシングが起こらないため、レニラルシフェラーゼ（2）は再構成（III）されず、生物発光（4）に顕著な変化が現れない。

この出願の発明の蛋白質相互作用解析用プローブにおいて使用されるinteinとしては、種々の生物由来の公知物質が適用できる。例えば、*Saccharomyces cerevisiae*（酵母）Sce VM

A、*Candida tropiallis* (ガンジタ菌) C t r VMAなどに代表される真核生物由来のもの、*Mycobacterium tuberculosis* (結核菌) M t u r e c Aなどの真正細菌由来のもの、*Thermoplasma asidophilum* (サーモプラスマアシドフィラム)
5 T a c VMAなどの古細菌由来のもの等が挙げられる。

この出願の発明の蛋白質相互作用解析用プローブ (1 c、 1 d)において、蛋白質a (3 a)と蛋白質b (3 b)の相互作用により intein が自動的に切り出されるためには、inteinは、部位特異的エンドヌクレアーゼであることが好ましい。さらに、この出願の発明の蛋白質相互作用解析用プローブ (1 c、 1 d)において、intein のスプライシングが有効に起こるためには、蛋白質前駆体において、スプライシングに関与する二つの部位が隣接するように、正しく折り畳まれ、かつ、各部位が正確に並べられなければならない (Duan, X., Gimble, F. S. and Quiocho, F. A., Cell 89, 555-564, 1997)。したがって、inteinとしては、生物由来のものをそのまま用いてもよいが、一部のアミノ酸残基を変換したり、削除したり、適当なリンカー配列を導入したりして、スプライシングが起こりやすいように設計されてもよい。

20 以上のとおりのこの出願の発明の蛋白質相互作用解析用プローブでは、プローブA (1 a) およびプローブB (1 b) は、各々、N-およびC-スプリットレニラルシフェラーゼのみからなるものであってもよいが、それぞれの末端にリンカー配列 (5 a、 5 b) を有していてもよい。このようにリンカー配列 (5 a、 5 b) を有する場合には、プローブA (1 a) とプローブB (1 b) はこれらのリンカー配列 (5 a、 5 b) を介して蛋白質

(3 a、3 b) と結合する。リンカー配列 (5 a、5 b) としては、各種のものが例示され、とくに限定されないが、例えば3～20アミノ酸残基からなるもの、具体的には、グリシンーアラニン繰り返し配列を有するもの等が挙げられる。

5 また、同様に、プローブA' (1 c) およびプローブB' (1 d) は、各々、intein のN-またはC-末端側のポリペプチド (6 a、6 b) とN-またはC-スプリットレニラルシフェラーゼ (2 a、2 b) のみからなるものであってもよいが、これら以外に、前記と同様のリンカー配列 (5 a、5 b) 等を含んでいて
10 もよい。つまり、プローブA' (1 c) およびプローブB' (1 d) において intein のポリペプチド (6 a、6 b) とスプリットレニラルシフェラーゼ (2 a、2 b) は、直接結合されていてもよいし、リンカー配列 (5 a、5 b) を介して結合されていてもよいのである。

15 この出願の発明の蛋白質相互作用解析用プローブ (1) において、用いられるN-およびC-スプリットレニラルシフェラーゼ (2 a および 2 b) とは、レニラルシフェラーゼを適当な位置で分割したN-末端側と残るC-末端側を意味するが、これらN-
20 およびC-スプリットレニラルシフェラーゼ (2 a および 2 b) は、蛋白質aおよびb (3 a、3 b) の相互作用 (III) により、あるいは、蛋白質aおよびb (3 a、3 b) の相互作用により生じる intein (6) のスプライシングにより、直接ペプチド結合し、再構成 (IV) されるものである。

したがって、このようなN-およびC-スプリットレニラルシ
25 フェラーゼ (2 a および 2 b) が再構成 (IV) 前 (個々のとき) には発光活性を示さず、再構成により酵素活性を取り戻すように

するために、活性中心を2つに分割するような分け方をする必要がある。具体的には、レニラルシフェラーゼをシステイン(Cys)、セリン(Ser)、またはチロシン(Tyr)の位置で分割することを試みた。

5 なお、後述の実施例にも示されるとおり、発明者らの研究によれば、プローブA（またはA'）におけるN-スプリットレニラルシフェラーゼを、ルシフェラーゼをSer91とTyr92の間で分割して得られるN-スプリットレニラルシフェラーゼとし、残るC-末端側を、プローブB（またはB'）におけるC-スプリットレニラルシフェラーゼとすることにより、とくに精度高い検出が可能となる。

この出願の発明では、以上のとおりの蛋白質相互作用解析用プローブが提供されるが、これを用いて蛋白質-蛋白質相互作用を解析するには、前記のとおり、一方のプローブ（例えばプローブA）を相互作用を確かめたい一方の蛋白質aに連結させ、もう一方のプローブ（プローブB）を相互作用を確認したいもう一方の蛋白質bに連結して両者を共存させ、生物発光(4)を検出、測定すればよい。なお、このとき、各蛋白質(3a、3b)とプローブ(1a、1b、1c、1d)の連結方法は、蛋白質やプローブに影響を及ぼさなければどのような方法であってもよい。例えば、通常用いられる化学的、生物化学的、あるいは、遺伝子工学的手法等が適用できる。

この出願の発明では、以上のとおりの蛋白質相互作用解析用プローブをセレンテラジンと酸素の存在下で共存させる方法としては、蛋白質相互作用解析用プローブ(1aおよび1b、または1cおよび1d)を各々相互作用を確認した蛋白質aおよびb(3

a、3 b) に結合させ、それらをセレンテラジンを含有する溶液に添加して共存させる方法があげられる。このような方法で蛋白質-蛋白質相互作用を解析を *in vitro* で検出・定量できる。

また、この出願の発明では、蛋白質相互作用解析用プローブ 5 (1) におけるプローブA (1 a) を連結した蛋白質aとプローブB (1 b) を連結した蛋白質b、または蛋白質相互作用解析用プローブA' (1 c) を連結した蛋白質a (3 a) とプローブB' (1 d) を連結した蛋白質b (3 b) を組み込んだ発現ベクターを、個々の培養細胞に導入する方法により、蛋白質aおよびb 10 (3 a、3 b) をセレンテラジンおよび酸素と共に存させることができる。なお、酸素は細胞内に存在する濃度で十分であり、新たに酸素を供給する必要はない。

このとき、発現ベクターとしては、動物細胞発現用のプラスミドベクターが好ましく用いられる。このようなプラスミドベクターを細胞に導入する方法としては、電気穿孔法、リン酸化カルシウム法、リポソーム法、DEAEデキストラン法等の公知の方法を採用することができる。このように、蛋白質相互作用解析用プローブ (1 aと1 b、または1 cと1 d) を連結した蛋白質 (3 aと3 b) を組み込んだ発現ベクターを細胞に導入する方法を用いることにより、細胞内で蛋白質相互作用解析用プローブ (1)、蛋白質 (3)、セレンテラジンおよび酸素が共存でき、細胞を破壊することなく、蛋白質-蛋白質相互作用を検出・定量する *in vivo* 法が可能となる。

さらに、この出願の発明の蛋白質相互作用の解析方法では、蛋白質相互作用解析用プローブA (1 a) を連結した蛋白質a (3 a) とプローブB (1 b) を連結した蛋白質b (3 b)、または

蛋白質相互作用解析用プローブA'（1c）を連結した蛋白質a（3a）とプローブB'（1d）を連結した蛋白質b（3b）を発現するポリヌクレオチドを細胞内に導入し、非ヒト動物全能性細胞を個体発生することによって、この動物またはその子孫動物
5 の全細胞において蛋白質相互作用解析用プローブ（1）、蛋白質（3）、セレンテラジンおよび酸素を共存させることもできる。このとき、酸素は、生体内に存在する濃度で十分であり、新たに添加する必要はない。

なお、この出願の発明では、このようにして得られるトランス
10 ジェニック非ヒト動物をも提供する。トランスジェニック非ヒト動物は、公知の作成法（例えば Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77; 7380-7384, 1980）に従って作成することができる。このようなトランスジェニック非ヒト動物は、すべての体細胞に蛋白質相互作用解析用プローブ（1）と蛋白質（3）を保有しているため、
15 例えば、その体内に医薬品や毒物などの試料物質を導入し、細胞および組織における蛋白質相互作用を解析することによって、蛋白質－蛋白質相互作用に関わる細胞内シグナル増強／抑制物質を精度高くスクリーニングすることができる。

この出願の発明の蛋白質－蛋白質相互作用の解析方法では、前記のとおりの作用原理および操作により発せられるルミネッセンス（生物発光）（4）を検出することにより蛋白質－蛋白質相互作用が起こったことを確認できる。また、レニラルシフェラーゼによる生物発光は組織透過性であることから、細胞内での発光を観察して画像化すれば、蛋白質－蛋白質相互作用が起こったタイミングのみならず、部位をも特定できる。さらに、特定の試料の添加や濃度など、条件を変化させた際の発光強度の変化を測定す

ることにより、蛋白質－蛋白質相互作用を定量することもできる。さらにまた、発光強度の変化を経時的に測定することにより、蛋白質－蛋白質相互作用の開始から終了までを追跡することもできる。

5 以下、添付した図面に沿って実施例を示し、この発明の実施の形態についてさらに詳しく説明する。もちろん、この発明は以下の例に限定されるものではなく、細部については様々な態様が可能であることは言うまでもない。

10 実施例

蛋白質のリン酸化に伴って、Y941 ペプチド（配列番号 2）と N－末端 SH2 ドメイン（SH2n）の間で生じる、公知の蛋白質－蛋白質相互作用（Ozawa, T. et al. *Anal. Chem.* 73, 2516-2521 (2001); Sato, M. et al. *Nat. Biotechnol.* 20, 287-15 294 (2002); Sato, M. et al. *Anal. Chem.* 71, 3948-3954 (1999).）について、本願発明の蛋白質相互作用解析用プローブを用いて可視化した。

なお、以下の実施例において、試薬は次のものを使用した。

制限酵素、修飾酵素およびリガーゼは Takara Biomedicals 20 (東京、日本) から購入した。

哺乳類において最も頻繁に用いられるコドンを含むレニラルシフェラーゼをコードする、合成レニラルシフェラーゼ遺伝子ベクター（hRL-CMV）およびレニラルシフェラーゼアッセイキットは Promega Co. (Madison, WI) から購入した。

25 哺乳類の発現ベクターである pcDNA3.1(+) および pIRES は、それぞれ Invitrogen (Groningen、オランダ) および Clonetech

(Palo Alto、CA) より入手した。

Ham's F-12 培地、ウシ胎児血清 (FBS) および LipofectAMINE
は Gibco BRL (Rockville、MD) から入手した。

抗 myc 抗体、抗 flag 抗体および抗リン酸化チロシン抗体
5 (PY20) は Santa CruzBiotechnology, Inc. (Santa Cruz、CA)
より購入した。

アルカリホスファターゼ標識化抗ウサギおよび抗マウス抗体
は、 Jackson ImmunoResearch Lab., Inc. (Pennsylvania、PA)
より購入した。

10 ニトロセルロース膜は Amersham Pharmacia Biotech
(Buckinghamshire、イギリス) より入手した。

CDP-STAR の化学ルミネッセンス基質は New England Biolabs.
Inc. (Beverly、MA) より購入した。

<実施例 1> 蛋白質相互作用解析用プローブの最適化

15 インスリン受容体基質-1 (insulin receptor substrate-1 :
以下、IRS1) 由来の Y941 ペプチド内の 941 チロシン残基は、イ
ンスリン刺激されると、インスリン受容体によりリン酸化され、
チロシンホスファターゼにより脱リン酸化される (Sato, M. et
al. *Anal Chem.* 71, 3948-3954 (1999); Pratipanawatr, W. et
20 al. *Diabetes* 50, 2572-2578 (2001)..)。また、ホスファチジル
イノシトール-3-キナーゼの p85 サブユニット (p85 330-429)
由来の SH2n は、 IRS1 内部のリン酸化された 941-チロシン残基
に結合する (Yoshimura, R. et al. *Diabetes* 46, 929-936
(1997); Golstein, B. J. et al. *J. Biol. Chem.* 1275, 4283-
25 4289 (2000)..)。

(1) プラスミドの構築

レニラルシフェラーゼの遺伝子をシステイン、セリンおよびチロシン近傍の 8 箇所で分割し、2 個の不活性なフラグメント（N-スプリットレニラルシフェラーゼ、C-スプリットレニラルシフェラーゼ）にした。

5 配列番号 1 および図 3 にレニラルシフェラーゼのアミノ酸配列と分割部位を示した。なお、本実施例においては、レニラルシフェラーゼ（hRL）の 124-システイン残基がアラニンに置換され、ルミネッセンス活性が増大されたレニラルシフェラーゼ変異体（hRL124C/A：配列番号 3）（Liu, J. et al. *Gene* 203, 141-
10 148 (1997).）を用いた。

N-スプリットレニラルシフェラーゼ（hRLn）およびC-スプリットレニラルシフェラーゼ（hRLc）を、それぞれ蛋白質（Y941 と SH2n）に結合させた。各スプリットレニラルシフェラーゼ融合蛋白質（sRL）のプラスミドの構成を図 4 に示した。なお、これらのプラスミドは、いずれも開始コドン上流に CMV-プロモーター配列を有するものとした。

Y941 のアミノ酸配列は TEEAYMKMDLGPG（配列番号 2）であり、これは IRS1 内部のチロシンリン酸化ドメインとなっている。SH2n はウシホスファチジルイノシトールの p85 サブユニットの N-末端 SH2 ドメインである。また、図 4 において、点線部分はリボソーム内部進入部位（IRES）を示す。さらに、sRL は、いずれも（翻訳終了コドン） - （リボソーム内部進入部位） - （翻訳開始コドン）より構成されるカセットを有するものとした。

25 さらに、蛋白質-蛋白質相互作用が生じた際に、N-およびC-スプリットレニラルシフェラーゼが確実に近接するようにする

ために、N-スプリットレニラルシフェラーゼと Y941 の間に、G-A リピートを含む柔軟な 18 アミノ酸残基からなるリンカー配列（配列番号 4）を、SH2n と C-スプリットレニラルシフェラーゼの間に同様のリンカー配列（配列番号 5）を挿入した。さらに、Myc および FLAG エピトープを N- および C-スプリットレニラルシフェラーゼの下流に挿入した。

なお、全てのプラスミド構築サブクローニングの微生物宿主としては、大腸菌株 DH5 α を用いた。また、プラスミドは、全てジーンアナライザ AB1 prism 310 (PE Biosystems、東京、日本) を用いた配列解析により確認した。

(2) 細胞培養と形質移入

CHO-HIR 細胞の生育は、10 %熱不活性化 FBS (Filtron)、100 unit/mL ペニシリン、および 100 μ g/mL ストレプトマイシンを添加した Ham's F-12 培地中で行った。形質移入は LipofectAMINE 2000 を用いて行った。

細胞を 6 ウエルの培養プレート上に播種し、前記いずれかのプラスミドを 2 ng 用いて形質移入を行った。形質移入の 6 時間後に LipofectAMINE を含む培地を FBS、ペニシリンおよびストレプトマイシンを添加した Ham's F-12 培地に置換し、40 時間インキュベートして各蛋白質相互作用解析用プローブを発現させた。

(3) 免疫沈降およびイムノプロット分析

CHO-HIR 細胞を、100 nM インスリンを用いて 37 °C で 5 分間刺激し、氷冷した 2x 免疫沈降緩衝液 (10 mM Tris-HCl (pH 7.4)、1 mM EDTA、1 mM EGTA、10 mM NaF、0.2 mM オルソバナジン酸ナトリウム、10 μ g/mL ロイペプチド、10 μ g/mL ペプスタチン、0.2 mM フェニルメチルスルホニルフルオライド (PMSF)、

2 % IGEPALCA630、1 % Triton X-100) により機械的に破碎した。

N-融合蛋白質は抗 myc 抗体により 4 °Cで 1 時間処理し、CHO-HIR 細胞の全細胞破碎液から免疫沈降した。この免疫沈降物を、蛋白質 G セファロース 4FF ピーズを用いて吸着し、次いで氷冷した免疫沈降緩衝液を用いて 5 回洗浄した。

試料を SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分離し、Y941 リン酸化については抗リン酸化チロシン抗体 (1:500) を用いて、N-末端蛋白質の評価には抗 myc 抗体 (1:500) を用いて、C-末端蛋白質の評価には抗 flag 抗体 (1:1000) を用いて分析した。

(4) 発光測定

37°Cで CHO-HIR 細胞のインスリン刺激を行った。また、発光強度はレニラルシフェラーゼアッセイキットを用いて測定した。

次に冷 PBS を用いて細胞を 2 回洗浄し、破碎した。破碎液を 4 °Cで 15,000 g、30 秒間遠心分離し、上澄の一部について、Minilumat LB9506 照度計 (Berthold GmbH & Co. KG, Wildbad, ドイツ) を用いて発光強度を 10 秒間測定した。上澄中の蛋白質濃度は Bradford 法により測定した。

(5) 結果

レニラルシフェラーゼの分割箇所と、蛋白質相互作用により生起した発光（インスリンの存在下における発光とインスリンの非存在下における発光の比）の関係を図 5 (a) に示した。また、全長レニラルシフェラーゼ (hRL124C/A) による発光強度に対する各蛋白質相互作用解析用プローブの相対発光強度を図 5 (b) に示した。

なお、各測定は、培養プレートの異なるウェルを用いて3回行った。

レニラルシフェラーゼが Ser91 と Tyr92 の間で分割された蛋白質相互作用解析用プローブ (sRL91) を発現した CHO-HIR 細胞は、 10^{-7} M インスリン存在下において、非存在下の場合と比べて 25 倍の発光強度を示した。

一方、レニラルシフェラーゼが他の位置で分割された蛋白質相互作用解析用プローブでは、 10^{-7} M インスリン存在下で 2~4 倍の増加が確認された。

10 <実施例 2>

実施例 1において、sRL91 を発現した CHO-HIR 細胞でのレニラルシフェラーゼの補完が蛋白質のリン酸化に起因する蛋白質-蛋白質相互作用により引き起こされたものであることを確認するために、sRL91 における Y941 ペプチド中の 941 番目のチロシン残基のリン酸化部位をフェニルアラニン残基に変換し、sRL91 変異体 (sRL91F) を作成した。N-末端側および C-末端側プローブを各々配列番号 6 および 7 に示した。

この sRL91F を用いて実施例 1 と同様の操作を行い、インスリン刺激の存在下および非存在下での発光強度を測定した。同様に、図 4 (c) および図 4 (d) のプラスミドを用いて sRL91 の N-末端側および C-末端側のみを個別に CHO-HIR 細胞に発現させ、各々の発光強度を測定した。

結果を図 6 に示した。

sRL91F を発現した CHO-HIR 細胞においては、インスリン刺激時の酵素活性の増加は見られなかった。また、sRL91 の N-末端側および C-末端側のみを個別に発現した CHO-HIR 細胞では、

インスリンの非存在下のみならず存在下においても、ルミネッセンス活性が完全に消失していた。

以上より、Y941 と SH2n 間の蛋白質－蛋白質相互作用により、レニラルシフェラーゼの補完が起こることが確認された。したがって、レニラルシフェラーゼを Ser91 と Tyr92 の間で分割したスプリットレニラルシフェラーゼを含む本願発明のプローブ(sRL91) が蛋白質相互作用解析用プローブとして有効であることが示された。

<実施例 3> 蛋白質－蛋白質相互作用の経時変化測定

前記の方法により sRL91 を発現した細胞を、100 nM または 10 pM インスリンを添加した培地において、1 分、5 分、10 分、30 分および 60 分間、37°C でインキュベートし、直ちにルミネッセンスを測定した。

Y941 と SH2n の間の相互作用の経時変化を図 7 に示した。

発光強度はインスリン刺激の 5 分後に増加し、以後は漸減した。

さらに、sRL91 を発現した細胞を、 10^{-7} M インスリンを添加した培地において、1 分、5 分、10 分、30 分および 60 分間、37°C でインキュベートし、抗 myc 抗体を用いて全細胞の破碎液の免疫沈降を行った。抗リン酸化チロシン抗体と抗 myc 抗体を用いて免疫プロッティングを行った。なお、抗体染色の可視化は、CDP-STAR を用い、LAS-1000 とイメージアナライザ (Fujifilm Co., 東京、日本) により行った。

得られた結果を図 8 に示した。

発光強度の経時変化とイムノプロッティングの結果は一致し、蛋白質相互作用の時間依存性は、チロシンのリン酸化および脱リ

ン酸化によるものであることが示唆された。

以上より、sRL91 の発光強度の変化が生細胞中で進行する蛋白質－蛋白質相互作用を直接的に反映することが確認された。

<実施例 4>

5 以上のような発光は、膜透過性基質であるセレンテラジンの存在下で、蛋白質－蛋白質相互作用が起こり、レニラルシフェラーゼが補完されることにより生じる。

そこで、次に本願発明の蛋白質相互作用解析用プローブを用いて生細胞内における特定の蛋白質－蛋白質相互作用の発生部位お
10 よび時間について非侵襲的に画像化することを検討した。

そこで、sRL91 を発現した CHO-HIR 細胞における Y941 と SH2D の間の蛋白質－蛋白質相互作用を画像化した。なお、細胞は、カールツァイス社の Axioverts100 顕微鏡に、40 倍の油浸対物レンズを付けた Till Vision V3.02 (PHOTONICS, Planegg, ドイツ) 15 により制御された冷却装置付きカメラ MicroMax (Roper Scientific Inc, Tucson, AZ) を取り付け、室温下で画像化した。

図 9 に、sRL91 を発現した CHO-IR 細胞の 10^{-7} M インスリン刺激の非存在下 (a) および存在下 (b) における顕微鏡像と全長 20 レニラルシフェラーゼ (hRL124C/A) を発現した CHO-IR 細胞の顕微鏡像を示した。

なお、撮影は CCD カメラを用い、20 %セレンテラジン基質緩衝液を添加した PBS 中で、露出時間をそれぞれ 300 秒 (a, b) および 60 秒 (c) として実施した。発光強度はカラースケ 25 ルで表した。

補完されたレニラルシフェラーゼにより放出された発光の増強

は、インスリン刺激時には細胞膜下においてのみ見られた（図 9 b）。一方、インスリン非存在下では、このような鮮やかな対照は見られなかった。

以上より、インスリン刺激による Y941 と SH2_n の間の相互作用が細胞膜下においてのみ生じることが示された。
5

さらに、全長レニラルシフェラーゼ (hRL124C/A) を発現した CHO-HIR 細胞では、細胞全体において均一にルミネッセンスが放出された（図 9 c）ことから、図 9 b の結果が細胞膜直下におけるセレンテラジンの過剰蓄積によるものではないことが示された。
10

<実施例 5 >

スプリットレニラルシフェラーゼを用いて、リン酸化されたアダプタープロテイン Shc と Grb2 の相互作用（図 10）を定量的に検出することに成功した。

15 その結果、epidermal growth factor (EGF)、17 β -estradiol (E2)、dihydrotestosterone (DHT) および diethylstilbestrol (DES) により細胞外から刺激した場合、Shc のリン酸化部位および Grb2 との相互作用部位に多くの選択性があることが示された。

20 リセプター型キナーゼに対する刺激、すなわち EGF 添加の場合、317 番目のチロシン基がリン酸化されて Grb2 と結合し、その結合には PTB ドメイン内のセリンが必要であることが示された。これは、Shc が PTB ドメイン内のセリンの存在によりリセプター型キナーゼに結合するためであると考えられる。

25 一方、E2 添加の場合、239 および 240 番目のチロシン基がリン酸化して Grb2 と結合するためには、PTB ドメイン内のセリン

の存在が必要であることが示された。一方、317番目のチロシンのリン酸化による Grb2との結合は、セリン存在下では起こらないことが示された。

また、DHT 添加および Estrogen Receptor に対するアゴニストとして知られる DES 添加の場合も、同様の結果が得られた（図 11）。

産業上の利用可能性

以上詳しく説明したとおり、この発明によって、生細胞における蛋白質－蛋白質相互作用を直接可視化できる蛋白質相互作用解析用プローブが提供される。このような蛋白質相互作用解析用プローブは、蛋白質－蛋白質相互作用によるレニラルシフェラーゼの補完を用いるものであるが、他の補完酵素系で用いられる拡散性の生成物 (Blakely, B. T. et al. *Nat. Biotechnol.* 18, 10 218-22 (2000); Rossi, F. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 8405-8410 (1997); Remy, I. & Michnick, S. W. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 5394-5399 (1999); Galarneau, A. et al. *Nat. Biotechnol.* 20, 619-622 (2002); Wehrman, T. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 3469-15 20 3474 (2002).) とは異なり、補完レニラルシフェラーゼによる生物発光は、生細胞や生物内において、蛋白質－蛋白質相互作用が発生した部位と時間を特定できる点で有用性が高い。

請求の範囲

1. 二つの蛋白質間の相互作用を解析するためのプローブであって、少なくともレニラルシフェラーゼのN-末端側のポリペプチドを含むプローブAと、少なくともレニラルシフェラーゼの残るC-末端側のポリペプチドを含むプローブBの二つのプローブからなることを特徴とする蛋白質相互作用解析用プローブ。
5
2. プローブAは、レニラルシフェラーゼのN-末端側のポリペプチドとともに *intein* のN-末端側のポリペプチドを含み、プローブBは、レニラルシフェラーゼの残るC-末端側のポリペプチドとともに *intein* のC-末端側のポリペプチドを含む請求項1の蛋白質相互作用解析用プローブ。
10
3. レニラルシフェラーゼのN-末端側のポリペプチドと、レニラルシフェラーゼの残るC-末端側のポリペプチドに、各々
15 リンカー配列が結合している請求項1または2のいずれかの蛋白質相互作用解析用プローブ。
4. リンカー配列は、3～20アミノ酸残基からなるものである請求項3の蛋白質相互作用解析用プローブ。
5. レニラルシフェラーゼのN-末端側のポリペプチドとレ
20 ニラルシフェラーゼの残るC-末端側のポリペプチドは、レニラルシフェラーゼを Ser91 と Tyr92 の間で分割して得られるものである請求項1ないし4の蛋白質相互作用解析用プローブ。
6. 請求項1ないし5記載のいずれかのプローブAを連結した蛋白質aと請求項1ないし5記載のいずれかのプローブBを連結した蛋白質bを、セレンテラジンと酸素の存在下で共存させ、
25 発光を測定することを特徴とする蛋白質-蛋白質相互作用の解析

方法。

7. 請求項 1 ないし 5 記載のいずれかのプローブ A を連結し

た蛋白質 a と請求項 1 ないし 5 記載のいずれかのプローブ B を連結し

た蛋白質 b を発現するポリヌクレオチドを細胞内に導入する

5 ことによりプローブ A を連結した蛋白質 a とプローブ B を連結し

た蛋白質 b をセレンテラジンと酸素の存在下で共存させる請求項

6 の蛋白質－蛋白質相互作用の解析方法。

8. 請求項 1 ないし 5 記載のいずれかのプローブ A を連結し

た蛋白質 a と請求項 1 ないし 5 記載のいずれかのプローブ B を連結し

10 蛋白質 b を発現するポリヌクレオチドを細胞内に導入し、

非ヒト動物全能性細胞を個体発生することによって、この動物ま

たはその子孫動物の全細胞においてプローブ A を連結した蛋白質

a とプローブ B を連結した蛋白質 b をセレンテラジンと酸素の存

在下で共存させる請求項 6 の蛋白質－蛋白質相互作用の解析方

15 法。

9. 請求項 1 ないし 5 記載のいずれかのプローブ A を連結し

た蛋白質 a と請求項 1 ないし 5 記載のいずれかのプローブ B を連結し

た蛋白質 b を発現するポリヌクレオチドを細胞内に導入し、

非ヒト動物全能性細胞を個体発生することによって得られる非ヒ

20 動物またはその子孫動物。

10. 請求項 9 の非ヒト動物またはその子孫動物に検査試料を

導入し、該非ヒト動物またはその子孫動物の細胞における蛋白質

相互作用を解析する物質のスクリーニング方法。

図 1

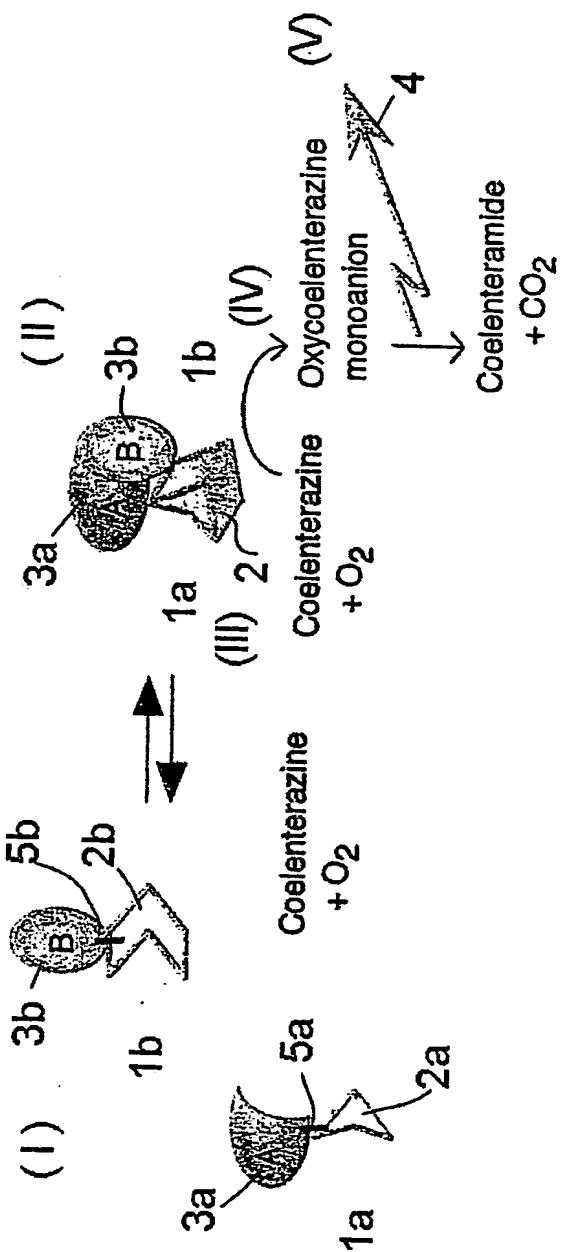


図 2

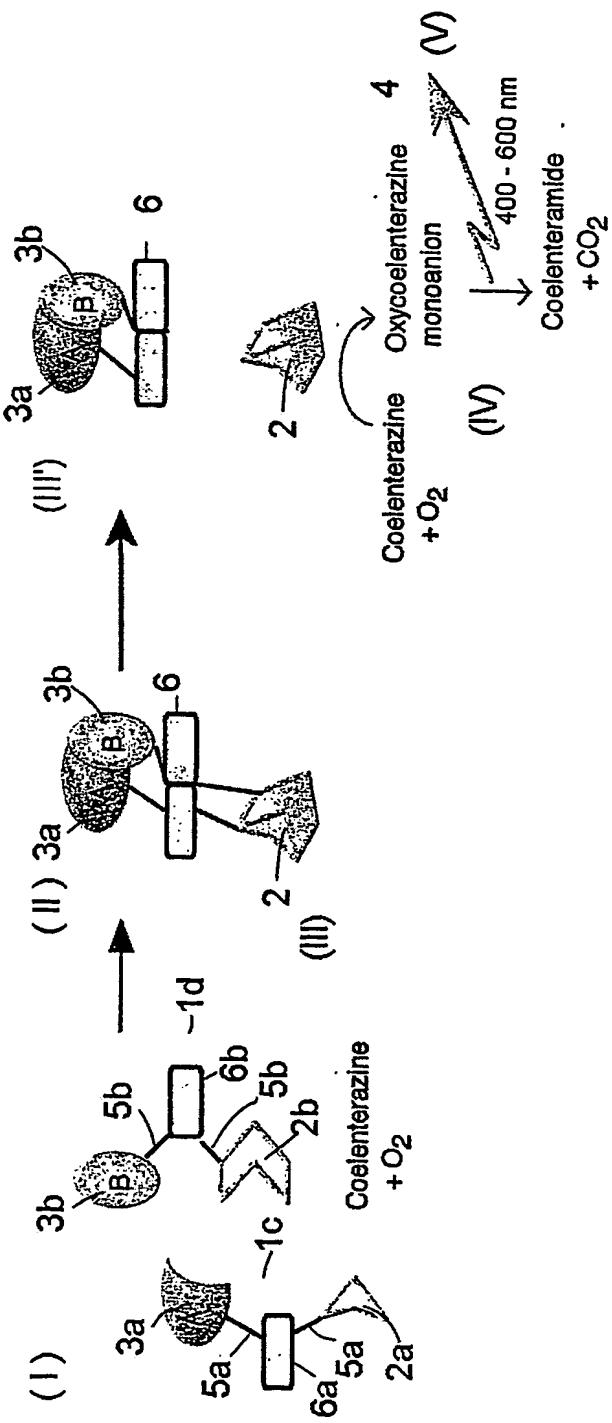


図 3

M T S K V Y D P E Q R K R M I T G P Q W W A R C K Q M N V L D S F I N Y Y D S E K H A E N A V I F L
 sRL23 sRL36
 sRL56 sRL57 sRL72 sRL91
 H G N A A S S Y L W R H V V P H I E P V A R C I I P D L I G M G K S G K S G N G S Y R L L D H Y K Y
 sRL123 sRL134
 L T A W F E L L N L P K K I I F V G H D W G A C L A F H Y C Y E H Q D K I K A I V H A E S V V D V I

E S W D E W P D I E E D I A L I K S E E G E K M V L E N N F F V E T W L P S K I M R K L E P E E F A

A Y L E P F K E K G E V R R P T L S W P R E I P L V K G G K P D V V Q I V R N Y N A Y L R A S D D L

P K M F I E S D P G F F S N A I V E G A K K F P N T E F V K V K G L H F S Q E D A P D E M G N Y

1 Q

図 4

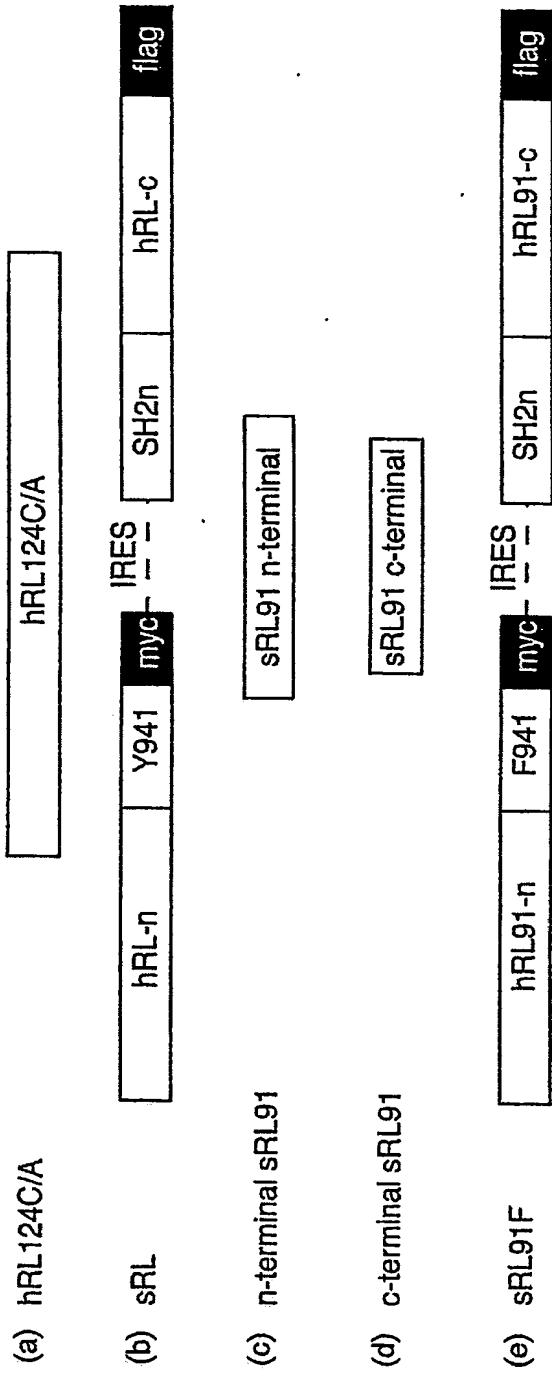


図 5

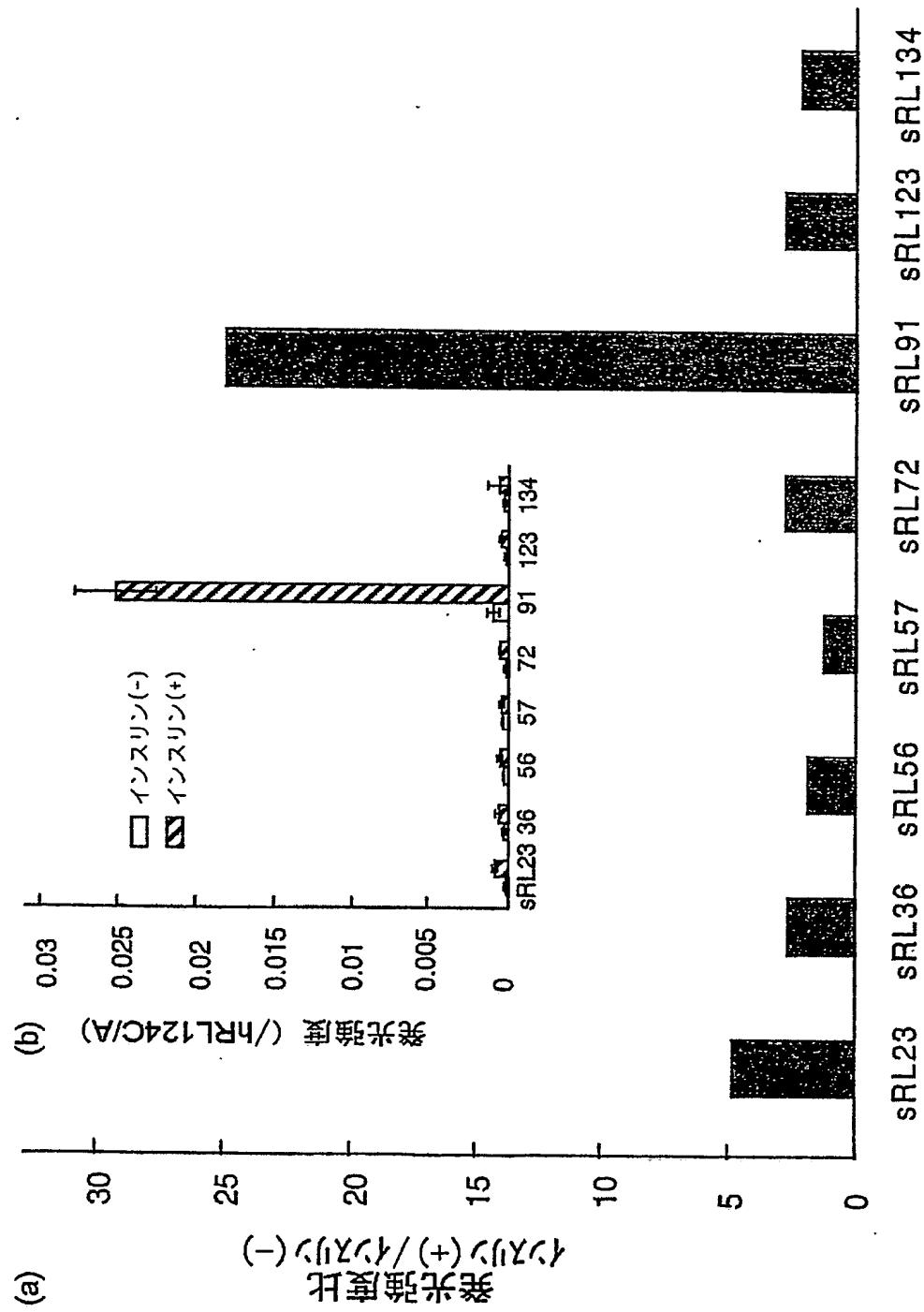


図 6

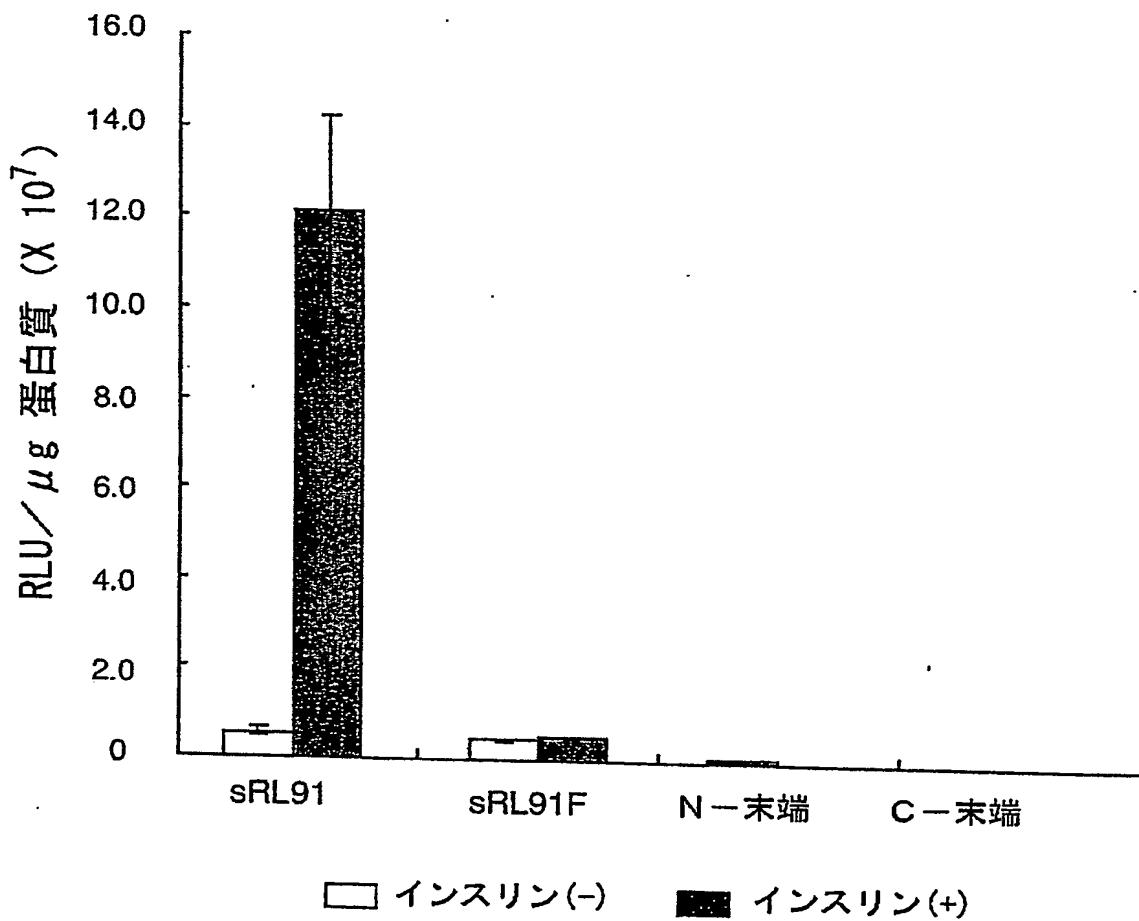


図 7

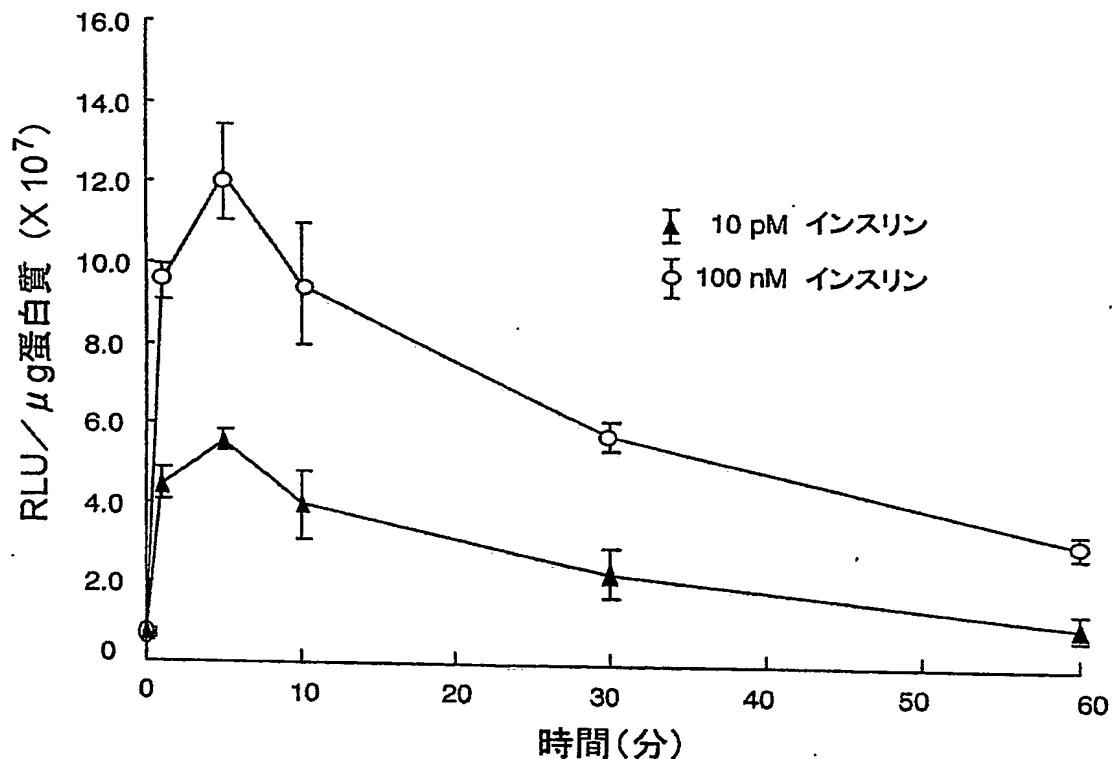


図 8

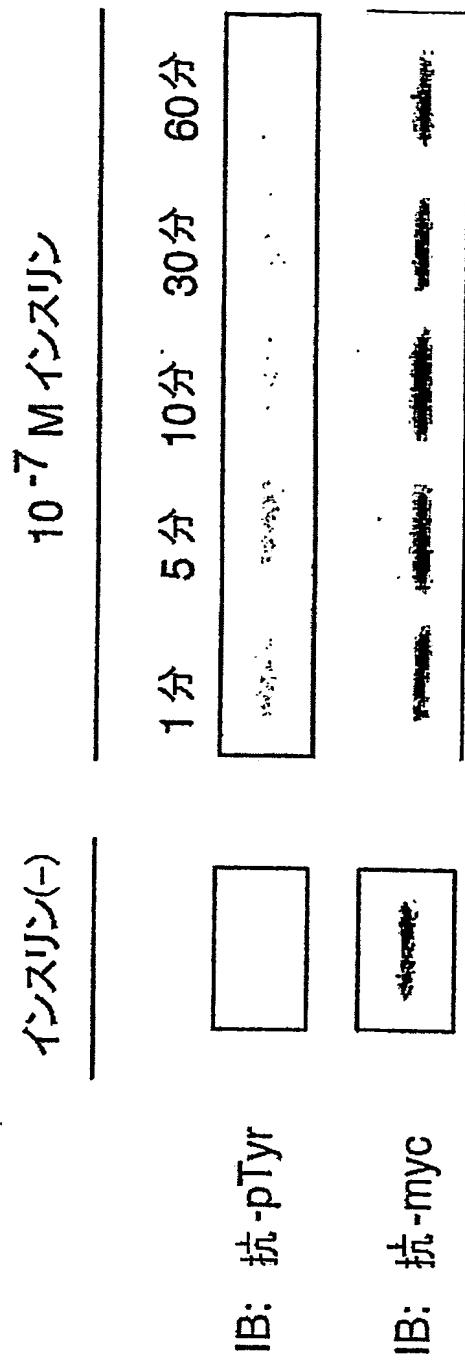


図 9

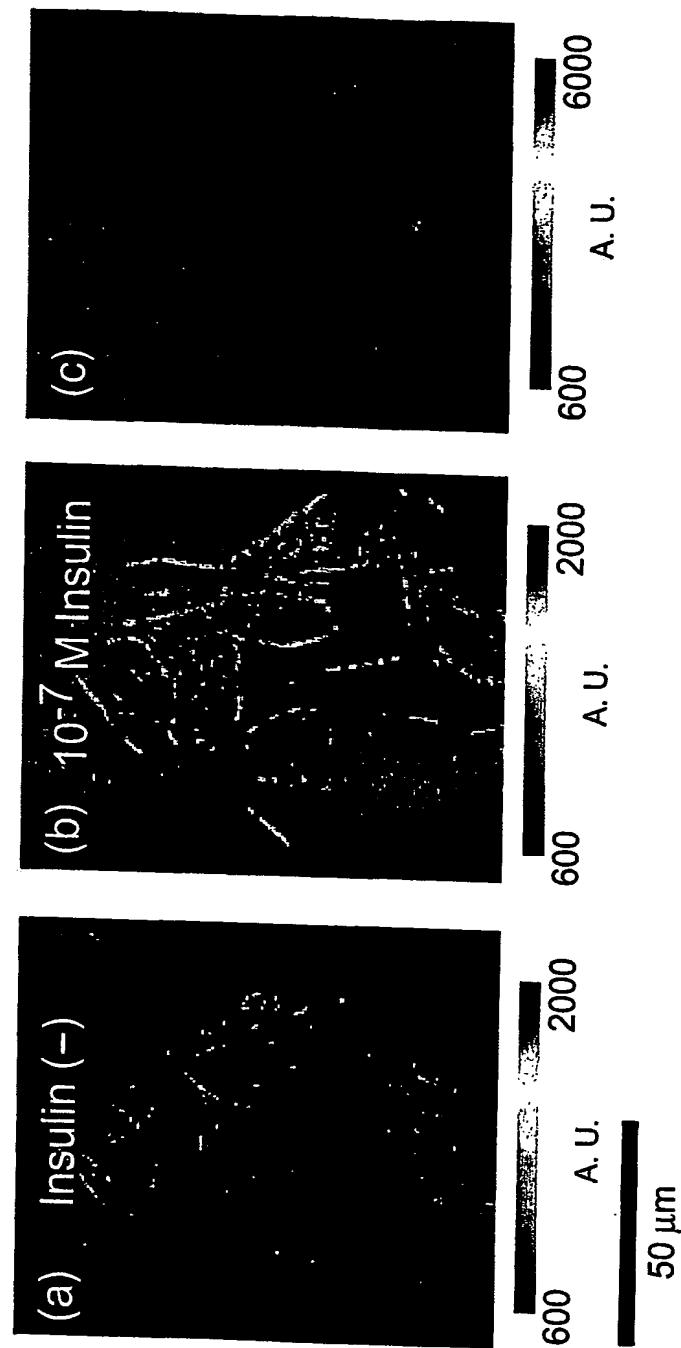


図 10

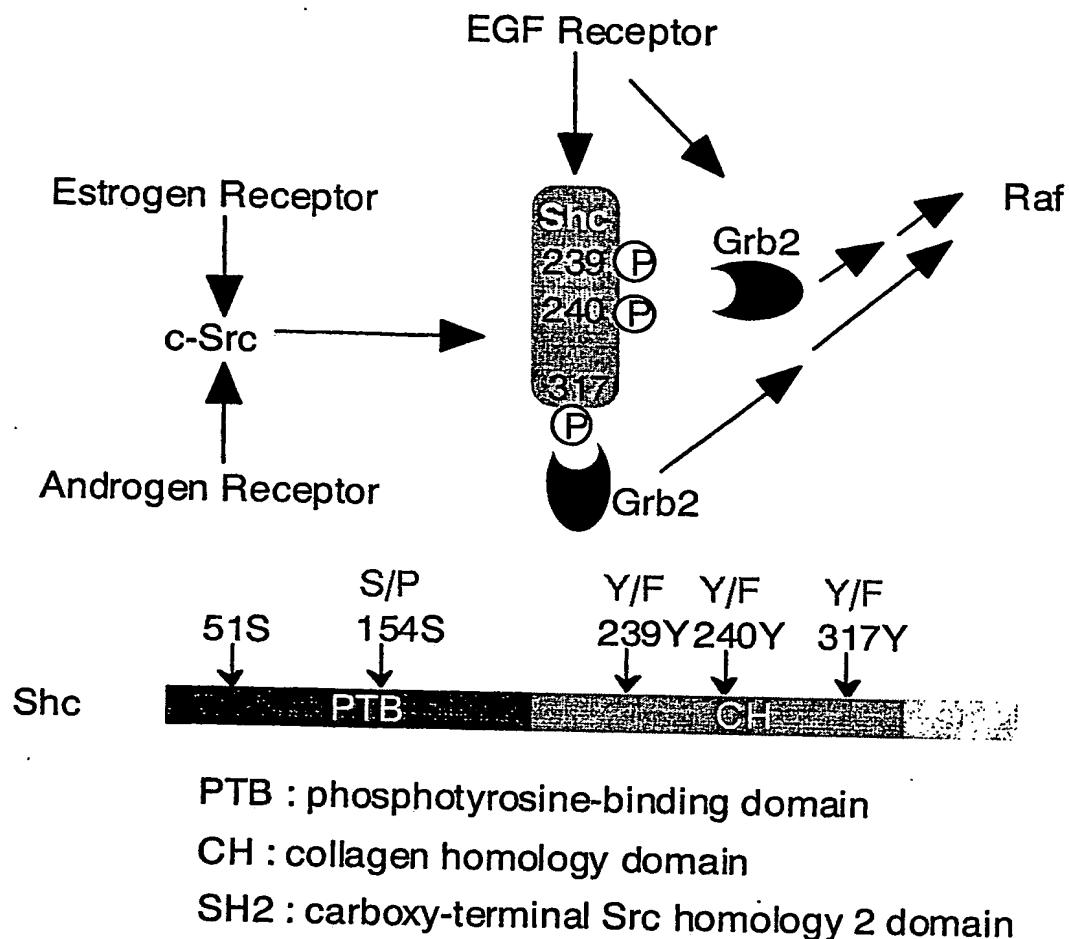
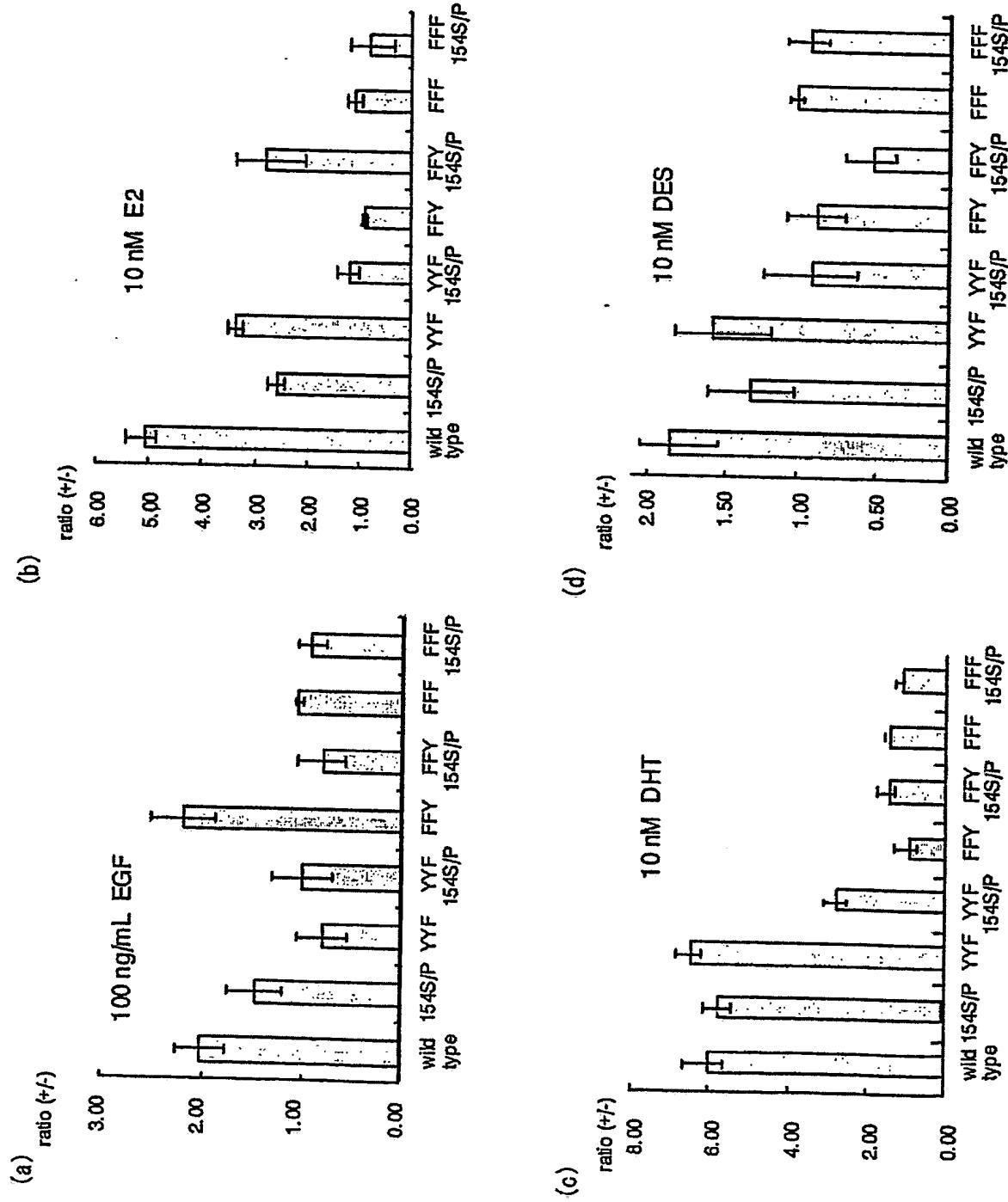


図 1-1



Sequence Listing

<110> Japan Science and Technology Corporation

<120> Probe for visualizing protein interaction and method of analyzing protein-protein interaction using the same

<130> 04F025PCT

<160> 6

<210> 1

<211> 300

<212> PRT

<213> *Renilla reniformis*

<400> 1

Met	Thr	Ser	Lys	Val	Tyr	Asp	Pro	Glu	Gln	Arg	Lys	Arg	Met	Ile
1								10					15	
Thr	Gly	Pro	Gln	Trp	Trp	Ala	Arg	Cys	Lys	Gln	Met	Asn	Val	Leu
16				20				25					30	
Asp	Ser	Phe	Ile	Asn	Tyr	Tyr	Asp	Ser	Glu	Lys	His	Ala	Glu	Asn
31				35				40					45	
Ala	Val	Ile	Phe	Leu	His	Gly	Asn	Ala	Ala	Ser	Ser	Tyr	Leu	Trp
46				50				55					60	
Arg	His	Val	Val	Pro	His	Ile	Glu	Pro	Val	Ala	Arg	Cys	Ile	Ile
61				65				70					75	
Pro	Asp	Leu	Ile	Gly	Met	Gly	Lys	Ser	Gly	Lys	Ser	Gly	Asn	Gly
76				80				85					90	
Ser	Tyr	Arg	Leu	Leu	Asp	His	Tyr	Lys	Tyr	Leu	Thr	Ala	Trp	Phe
91				95				100					105	
Glu	Leu	Leu	Asn	Leu	Pro	Lys	Lys	Ile	Ile	Phe	Val	Gly	His	Asp
106				110				115					120	
Trp	Gly	Ala	Cys	Leu	Ala	Phe	His	Tyr	Cys	Tyr	Glu	His	Gln	Asp
121				125				130					135	
Lys	Ile	Lys	Ala	Ile	Val	His	Ala	Glu	Ser	Val	Val	Asp	Val	Ile
136				140				145					150	

Glu Ser Trp Asp Glu Trp Pro Asp Ile Glu Glu Asp Ile Ala Leu
151 155 160 165
Ile Lys Ser Glu Glu Gly Glu Lys Met Val Leu Glu Asn Asn Phe
166 170 175 180
Phe Val Glu Thr Met Leu Pro Ser Lys Ile Met Arg Lys Leu Glu
181 185 190 195
Pro Glu Glu Phe Ala Ala Tyr Leu Glu Pro Phe Lys Glu Lys Gly
196 200 205 210
Glu Val Arg Arg Pro Thr Leu Ser Trp Pro Arg Glu Ile Pro Leu
211 215 220 225
Val Lys Gly Gly Lys Pro Asp Val Val Gln Ile Val Arg Asn Tyr
226 230 235 240
Asn Ala Tyr Leu Arg Ala Ser Asp Asp Leu Pro Lys Met Phe Ile
241 245 250 255
Glu Ser Asp Pro Gly Phe Phe Ser Asn Ala Ile Val Glu Gly Ala
256 260 265 270
Lys Lys Phe Pro Asn Thr Glu Phe Val Lys Val Lys Gly Leu His
271 275 280 285
Phe Ser Gln Glu Asp Ala Pro Asp Glu Met Gly Asn Tyr Ile Gln
286 290 295 300

<210> 2

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<223> Synthesized Oligopeptide

<400> 2

Thr Glu Glu Ala Tyr Met Lys Met Asp Leu Gly Pro Gly
1 5 10

<210> 3

<211> 32

<211> 300

<212> PRT

<213> *Renilla reniformis*

<400> 3

Met	Thr	Ser	Lys	Val	Tyr	Asp	Pro	Glu	Gln	Arg	Lys	Arg	Met	Ile
1				5				10					15	
Thr	Gly	Pro	Gln	Trp	Trp	Ala	Arg	Cys	Lys	Gln	Met	Asn	Val	Leu
16				20				25					30	
Asp	Ser	Phe	Ile	Asn	Tyr	Tyr	Asp	Ser	Glu	Lys	His	Ala	Glu	Asn
31				35				40					45	
Ala	Val	Ile	Phe	Leu	His	Gly	Asn	Ala	Ala	Ser	Ser	Tyr	Leu	Trp
46				50				55					60	
Arg	His	Val	Val	Pro	His	Ile	Glu	Pro	Val	Ala	Arg	Cys	Ile	Ile
61				65				70					75	
Pro	Asp	Leu	Ile	Gly	Met	Gly	Lys	Ser	Gly	Lys	Ser	Gly	Asn	Gly
76				80				85					90	
Ser	Tyr	Arg	Leu	Leu	Asp	His	Tyr	Lys	Tyr	Leu	Thr	Ala	Trp	Phe
91				95				100					105	
Glu	Leu	Leu	Asn	Leu	Pro	Lys	Lys	Ile	Ile	Phe	Val	Gly	His	Asp
106				110				115					120	
Trp	Gly	Ala	Ala	Leu	Ala	Phe	His	Tyr	Cys	Tyr	Glu	His	Gln	Asp
121				125				130					135	
Lys	Ile	Lys	Ala	Ile	Val	His	Ala	Glu	Ser	Val	Val	Asp	Val	Ile
136				140				145					150	
Glu	Ser	Trp	Asp	Glu	Trp	Pro	Asp	Ile	Glu	Glu	Asp	Ile	Ala	Leu
151				155				160					165	
Ile	Lys	Ser	Glu	Glu	Gly	Glu	Lys	Met	Val	Leu	Glu	Asn	Asn	Phe
166				170				175					180	
Phe	Val	Glu	Thr	Met	Leu	Pro	Ser	Lys	Ile	Met	Arg	Lys	Leu	Glu
181				185				190					195	

Pro Glu Glu Phe Ala Ala Tyr Leu Glu Pro Phe Lys Glu Lys Gly
196 200 . 205 210
Glu Val Arg Arg Pro Thr Leu Ser Trp Pro Arg Glu Ile Pro Leu
211 215 220 225
Val Lys Gly Gly Lys Pro Asp Val Val Gln Ile Val Arg Asn Tyr
226 230 235 240
Asn Ala Tyr Leu Arg Ala Ser Asp Asp Leu Pro Lys Met Phe Ile
241 245 250 255
Glu Ser Asp Pro Gly Phe Phe Ser Asn Ala Ile Val Glu Gly Ala
256 260 265 270
Lys Lys Phe Pro Asn Thr Glu Phe Val Lys Val Lys Gly Leu His
271 275 280 285
Phe Ser Gln Glu Asp Ala Pro Asp Glu Met Gly Asn Tyr Ile Gln
286 290 295 300

<210> 4

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<223> Synthesized Oligopeptide

<400> 4

Cys Leu Ser Leu Ala Ser Asn Asn Gly Asn Gly Arg Asn Gly Ala
1 5 10 15
Ser Leu Glu

16

<210> 5

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<223> Synthesized Oligopeptide

<400> 5

Pro Arg Gly Asn Asn Gly Gly Asn Asn Asp Val Met Ala Ile Ala

1

5

10

15

Ala Asn

16

<210> 6

<211> 133

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<223> Synthesized Oligopeptide

<400> 6

Met Thr Ser Lys Val Tyr Asp Pro Glu Gln Arg Lys Arg Met Ile

1

5

10

15

Thr Gly Pro Gln Trp Trp Ala Arg Cys Lys Gln Met Asn Val Leu

16

20

25

30

Asp Ser Phe Ile Asn Tyr Tyr Asp Ser Glu Lys His Ala Glu Asn

31

35

40

45

Ala Val Ile Phe Leu His Gly Asn Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Trp

46

50

55

60

Arg His Val Val Pro His Ile Glu Pro Val Ala Arg Cys Ile Ile

61

65

70

75

Pro Asp Leu Ile Gly Met Gly Lys Ser Gly Lys Ser Gly Asn Gly

76

80

85

90

Ser Cys Leu Ser Leu Ala Ser Asn Asn Gly Asn Gly Arg Asn Gly

91

95

100

105

Ala Ser Leu Glu Thr Glu Glu Tyr Met Lys Met Asp Leu Gly Pro

106

110

115

120

Gly Thr Arg Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu

121

125

130

<210> 7

<211> 352

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<223> Synthesized Oligopeptide

<400> 7

Met Asp Ala Glu Trp Tyr Trp Gly Asp Ile Ser Arg Glu Glu Val
1 5 10 15
Asn Glu Lys Leu Arg Asp Thr Ala Asp Gly Thr Phe Leu Val Arg
16 20 25 30
Asp Ala Ser Thr Lys Met His Gly Asp Tyr Thr Leu Thr Leu Arg
31 35 40 45
Lys Gly Gly Asn Asn Lys Leu Ile Lys Ile Phe His Arg Asp Gly
46 50 55 60
Lys Tyr Gly Phe Ser Asp Pro Leu Thr Phe Asn Ser Val Val Glu
61 65 70 75
Leu Ile Asn His Tyr Arg Asn Glu Ser Leu Ala Gln Tyr Asn Pro
76 80 85 90
Lys Leu Asp Val Lys Leu Leu Tyr Pro Val Ser Lys Tyr Gln Gln
91 95 100 105
Pro Arg Gly Asn Asn Gly Gly Asn Asn Asp Val Met Ala Ile Ala
106 110 115 120
Ala Asn Tyr Arg Leu Leu Asp His Tyr Lys Tyr Leu Thr Ala Trp
121 125 130 135
Phe Glu Leu Leu Asn Leu Pro Lys Lys Ile Ile Phe Val Gly His
136 140 145 150
Asp Trp Gly Ala Cys Leu Ala Phe His Tyr Ser Tyr Glu His Gln
151 155 160 165
Asp Lys Ile Lys Ala Ile Val His Ala Glu Ser Val Val Asp Val
166 170 175 180
Ile Glu Ser Trp Asp Glu Trp Pro Asp Ile Glu Glu Asp Ile Ala
181 185 190 195

Leu Ile Lys Ser Glu Glu Gly Glu Lys Met Val Leu Glu Asn Asn
196 200 205 210
Phe Phe Val Glu Thr Met Leu Pro Ser Lys Ile Met Arg Lys Leu
211 215 220 225
Glu Pro Glu Glu Phe Ala Ala Tyr Leu Glu Pro Phe Lys Glu Lys
226 230 235 240
Gly Glu Val Arg Arg Pro Thr Leu Ser Trp Pro Arg Glu Ile Pro
241 245 250 255
Leu Val Lys Gly Gly Lys Pro Asp Val Val Gln Ile Val Arg Asn
256 260 265 270
Tyr Asn Ala Tyr Leu Arg Ala Ser Asp Asp Leu Pro Lys Met Phe
271 275 280 285
Ile Glu Ser Asp Pro Gly Phe Phe Ser Asn Ala Ile Val Glu Gly
286 290 295 300
Ala Lys Lys Phe Pro Asn Thr Glu Phe Val Lys Val Lys Gly Leu
301 305 310 315
His Phe Ser Gln Glu Asp Ala Pro Asp Glu Met Gly Lys Tyr Ile
316 320 325 330
Lys Ser Phe Val Glu Arg Val Leu Lys Asn Glu Gln Pro Arg Asp
331 335 340 345
Tyr Lys Asp Asp Val Val Lys
346 350

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/007245

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12Q1/66, A01K67/027

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl⁷ C12Q1/66, A01K67/027

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
MEDLINE (STN), BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG),
SwissProt/PIR/Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	PAULMURUGAN R. et al., "Monitoring protein-protein interactions using split synthetic renilla luciferase protein-fragment-assisted complementation.", Anal.Chem., 01 April, 2003 (01.04.03); 75(7): 1584-9	1 2-10
Y	PAULMURUGAN R. et al., "Noninvasive imaging of protein-protein interactions in living subjects by using reporter protein complementation and reconstitution strategies.", Proc.Natl.Acad.Sci.USA., 2002; 99(24): 15608-13	2-10
Y	JP 2002-501758 A (PACKARD INSTRUMENT CO.), 22 January, 2002 (22.01.02), & WO 99/38999 A1 & EP 1060263 A1 & US 6171809 B1 Par. Nos. [0006] to [0008]	6-8

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

- * Special categories of cited documents:
- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
16 June, 2004 (16.06.04)

Date of mailing of the international search report
06 July, 2004 (06.07.04)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.
Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2004)

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/007245

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.b of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:
 - a. type of material
 - a sequence listing
 - table(s) related to the sequence listing
 - b. format of material
 - in written format
 - in computer readable form
 - c. time of filing/furnishing
 - contained in the international application as filed
 - filed together with the international application in computer readable form
 - furnished subsequently to this Authority for the purposes of search
2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP2004/007245

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））
Int. Cl' C12Q1/66, A01K67/027

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））
Int. Cl' C12Q1/66, A01K67/027

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）
MEDLINE(STN), BIOSIS(DIALOG), WPI(DIALOG)
SwissProt/PIR/Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y	PAULMURUGAN R. et al., Monitoring protein-protein interactions using split synthetic renilla luciferase protein-fragment-assisted complementation. Anal. Chem. 2003 Apr 1;75(7):1584-9	1 2-10
Y	PAULMURUGAN R. et al., Noninvasive imaging of protein-protein interactions in living subjects by using reporter protein complementation and reconstitution strategies. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 2002; 99(24):15608-13	2-10

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
- 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
- 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
- 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
- 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

16. 06. 2004

国際調査報告の発送日

06. 7. 2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官（権限のある職員）

佐久 敬

4B

3037

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP2004/007245

C (続き) 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	JP 2002-501758 A (PACKARD INSTRUMENT COMPANY) 2002.01.22 & WO 99/38999 A1 & EP 1060263 A1 & US 6171809 B1 段落【0006】-【0008】参照	6-8

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP2004/007245

第I欄 ヌクレオチド又はアミノ酸配列（第1ページの1. bの続き）

1. この国際出願で開示されかつ請求の範囲に係る発明に必要なヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下に基づき国際調査を行った。
 - a. タイプ 配列表 配列表に関連するテーブル
 - b. フォーマット 書面 コンピュータ読み取り可能な形式
 - c. 提出時期 出願時の国際出願に含まれる この国際出願と共にコンピュータ読み取り可能な形式により提出された 出願後に、調査のために、この国際調査機関に提出された
2. さらに、配列表又は配列表に関連するテーブルを提出した場合に、出願後に提出した配列若しくは追加して提出した配列が出願時に提出した配列と同一である旨、又は、出願時の開示を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。
3. 補足意見：